

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

PATENTSCHRIFT

(11) DD 287 950 A5

5(51) C 12 N 11/08

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 332 719 2	(22)	15.09.89	(44)	14.03.91
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate				

(55) Verfahren; kovalente Bindung; Polyoxyalkylenglykole; biologisch aktive Verbindungen; bifunktionelle Aktivierungsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate mit primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen und Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltenden, funktionellen Gruppen werden in einem ersten Reaktionsschritt mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln in aktivierte Polymere überführt. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die kovalente Bindung von biologisch aktiven Verbindungen, zum Beispiel von biokatalytisch aktiven oder inaktiven Proteinen und höher integrierten Systemen wie Mikroorganismen an die aktivierten Polymeren. Die Umsetzungen erfolgen in wässrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen oder, gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels. Die modifizierten, biologisch aktiven Verbindungen werden in der Biotechnologie und Medizin eingesetzt.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

BEST AVAILABLE COPY

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate, dadurch gekennzeichnet, daß biologisch aktive Verbindungen an Thiolgruppen, primäre Aminogruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltende Polymere, abgeleitet vom Polymertyp der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, die in wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2 bis 12 oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Lösungsmittelgemischen aus organischen Lösungsmitteln oder Gemischen von wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 8 Stunden, gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels oder einer Puffersubstanz, mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln aktiviert werden, in wäßrigen Lösungen, gegebenenfalls gepuffert oder in organischen Lösungsmitteln, gegebenenfalls in Gegenwart säurebindender Mittel oder Gemischen aus wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln, die gegebenenfalls gepuffert oder mit säurebindenden Mitteln versetzt sind oder Gemischen organischer Lösungsmittel, gegebenenfalls ebenfalls in Gegenwart von säurebindenden Mitteln, im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Temperaturen von 0°C bis 150°C kovalent gebunden werden und die Isolierung und Reinigung nach an sich bekannten Verfahren erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch aktive Verbindungen Biokatalysatoren wie Enzyme, Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme und Koenzyme oder biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine, zuckerbindende Proteine oder in vitro hergestellte Konjugate aus Biokatalysatoren und biokatalytisch inaktiven Proteinen oder nieder- und hochmolekulare Effektoren wie Nukleinsäuren, Bruchstücke von Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka, Sauerstoff bindende, aktivierende und transportierende, synthetische Verbindungen sowie Affinitätsliganden eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als bi- oder multifunktionelle Aktivierungsmittel Dialdehyde, diazotierte, aromatische Diamine, Diisocyanate, Diisobiocyanate, gleichzeitig Diisocyanat- und Diisothiocyanatgruppen enthaltende Verbindungen, bisaktivierte Derivate von Dikarbonsäuren wie Säurechloride, Säureazide und aktivierte Ester, Diepoxide, Chinone, Epihalogenhydrine, Karbodilimide, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine oder 2-substituierte, 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivierungsreaktionen in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel im Verlaufe von 30 Minuten bis 6 Stunden bei Reaktionstemperaturen von 20°C bis 80°C ausgeführt werden, bei Säuren freisetzenden Aktivierungsreaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2,0 bis 12,0 bei 0°C bis 60°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart einer Puffersubstanz oder eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Bindung von Biokatalysatoren, vorzugsweise von Enzymen, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, bei 0°C bis 100°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, 4, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß als säurebindende Mittel tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalisalze kondensierter Aromaten und Heteroaromaten eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Biokatalysatoren Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen eingesetzt werden.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Das Verfahren und die danach hergestellten Verbindungen können in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin angewendet werden.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Makromolekulare Verbindungen mit Aminogruppen werden sehr oft und solche mit Thiol-, Amidoxim-, Hydroxamsäure- oder Karbonsäurehydrazidgruppen weniger zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen verwendet (Methods Enzymol. 1988, 137, [Immobilized Enzymes and Cells], Pt. A-D, Ed. by K. Mosbach). In dieser Form können die mit den genannten, funktionellen Gruppen versehenen Makromoleküle bei Immobilisierungsreaktionen allerdings nur eingesetzt werden, wenn reaktive, hochaktivierte Gruppen besitzende, biologisch aktive Verbindungen an die Makromoleküle kovalent gebunden werden sollen. In der Regel werden bei Immobilisierungsreaktionen aber die makromolekularen Verbindungen mit den genannten, funktionellen Gruppen vor der kovalenten Bindung der biologisch aktiven Verbindungen aktiviert, was praktisch bedeutet, daß die funktionellen Gruppen der Makromoleküle in einen solchen reaktiven Zustand überführt werden müssen, daß eine Verdünnungsreaktion beider Komponenten erfolgen kann.

In Amino-, Thiol-, Amidoxim-, Karbonsäurehydrazid- und Hydroxamsäuregruppen- in letzteren Verbindungen kann als tautomere Form ebenfalls die Oximgruppe  $=\text{NOH}$  vorliegen – enthaltenden Verbindungen besitzen die funktionellen Gruppen nukleophile Eigenschaften, so daß die nukleophilen Substitutionsreaktionen und auch verschiedenartigsten Additionsreaktionen zugänglich sind. Diese Reaktionstypen gehören zu den grundlegenden Reaktionen der Syntheschemie, und auf diese Weise können durch eine Vielzahl von Verknüpfungsreaktionen von zwei oder mehreren bekannten Verbindungen neue Verbindungen synthetisiert werden. Diese Reaktionsprinzipien werden auch zur Aktivierung der zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen geeigneten, unlöslichen Makromoleküle wie Zellulose, Sepharosen, Sephadex oder Polyhydroxyethylmethakrylate angewendet. Mit Vorteil werden in diesen Fällen sehr oft bi- beziehungsweise multifunktionelle, niedermolekulare Aktivierungsmittel verwendet, weil auf diese Weise schon nach einem Reaktionsschritt das Makromolekül in aktivierter Form vorliegt. Unter den bi- oder multifunktionellen und zur Aktivierung von Makromolekülen geeigneten Aktivierungsmitteln sind eine Vielzahl leicht zugänglicher, chemischer Reagentien, die für eine Aktivierung in Frage kommen. Einige wichtige sind zum Beispiel Dialdehyde, aktivierte Dikarbonsäurederivate, aliphatische, durch Aktivierung reaktiv gemachte aromatische und heteroaromatische Dihalogenide beziehungsweise höher halogenierte Verbindungen und funktionalisierte und gleichzeitig reaktiv gemachte Diaminoverbindungen.

In wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln lösliche Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate sind für verschiedene Anwendungsfälle von Interesse, vor allem in der Biotechnologie und angewandten, medizinischen Forschung. Das setzt in jedem Falle auch die Funktionalisierung dieser Polymeren, am besten durch kovalente Verknüpfung, mit biologisch aktiven Verbindungen voraus. Diese kovalente Bindung von biologisch aktiven Verbindungen erfordert aber, daß zunächst einmal reaktive Derivate der genannten Polymeren vorliegen, die zu diesen Verknüpfungsreaktionen befähigt sind. Die bisher beschriebenen Methoden zur Aktivierung und Funktionalisierung mit biologisch aktiven Verbindungen der hydroxylgruppenhaltigen Polyoxyalkylenglykole und der Monoalkoxyderivate dieser Polymeren (Life Sci., 1983, 33, 1467–1473) reichen für eine breite Anwendung aber mit Sicherheit nicht aus. Mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Derivate der Polyoxyalkylenglykole und ihre gleichartig substituierten Monoalkoxyderivate stellen ebenso geeignete Derivate dieser Polymeren dar, um biologisch aktive Verbindungen an sie kovalent zu binden, zumal mit diesen reaktiven Gruppen substituierte Polymere der genannten Art aus den hydroxylgruppenhaltigen Ausgangspolymeren durch in der Regel einfache chemische Reaktionen synthetisiert werden können.

## Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, biologisch aktive Verbindungen an mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate nach Aktivierung der genannten, funktionellen Gruppen kovalent zu binden. Dadurch sollen modifizierte, biologisch aktive Verbindungen mit breiten Anwendungsmöglichkeiten erhalten werden.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen und Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polyoxyalkylenglykole oder ihre ebenso substituierten Monoalkoxyderivate in eine aktivierte Form zu überführen und an diese aktivierten Polymeren biologisch aktive Verbindungen kovalent zu binden. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltende Polymere, abgeleitet vom Typ der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, in wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2,0 bis 12,0 oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Gemischen organischer Lösungsmittel oder Gemischen von wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 8 Stunden, gegebenenfalls in Gegenwart einer Puffersubstanz oder eines säurebindenden Mittels, mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln umgesetzt und aktiviert werden und an die aktivierten Polymeren in wäßrigen Lösungen, die gegebenenfalls

gepuffert sind oder Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln oder in organischen Lösungsmitteln oder in Gemischen organischer Lösungsmittel, in letzteren beiden Fällen gegebenenfalls in Gegenwart säurebindender Mittel, im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Temperaturen von 0°C bis 150°C biologisch aktive Verbindungen kovalent gebunden werden. Als biologisch aktive Verbindungen für die erfindungsgemäße, kovalente Bindung an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate werden nieder- und hochmolekulare Verbindungen eingesetzt. Neben ihrer biologischen Wirksamkeit ist für eine erfolgreiche und stabile Bindung an die genannten Polymeren das Vorliegen reaktiver, funktioneller Gruppen zusätzliche Voraussetzung. Erfindungsgemäß werden biokatalytisch aktive Verbindungen wie Enzyme – bevorzugt solche aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen-Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme oder Koenzyme, aber auch biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine und zuckerbindende Proteine wie die Lektine kovalent gebunden. Andere biologisch aktive Verbindungen, die den zuvor genannten Kategorien nicht zugeordnet werden können und die für eine kovalente Bindung an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate in Frage kommen, sind zum Beispiel Nukleinsäuren, Bruchstücke der Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka sowie Sauerstoff bindende, transportierende und aktivierende, synthetische Verbindungen.

Als bi- oder multifunktionelle Aktivierungsmittel für mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate werden Dialdehyde, aromatische, diazierte Diamine, Disocyanate, Diisothiocyanate, Säurechloride, Säureazide, und aktivierte Ester von Dikarbonsäuren, Diepoxide, Chinone, Karbodiimide, Epihalogenhydrine, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine, oder 2-substituierte 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine verwendet, wobei die Auswahl der bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmittel auch durch die Reaktivität der substituierten Polymeren bestimmt wird. Die Aktivierungsreaktionen werden vorzugsweise in organischen Lösungsmitteln ausgeführt und dann bei Reaktionstemperaturen von 20°C bis 80°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 6 Stunden. Da bei einer Reihe von Reaktionen Säuren freigesetzt werden, wird in diesen Fällen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels gearbeitet, zum Beispiel einem tertiären Amin, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxiden, Alkalikarbonaten, Alkalialkoholaten oder Alkalisalzen kondensierter Aromaten und Heteroaromaten. Die ebenfalls möglichen Aktivierungsreaktionen mit einer Reihe bi- oder multifunktioneller Aktivierungsmittel in wässrigen Lösungen werden bei säurefreisetzen Reaktionen vorzugsweise in Gegenwart von Puffersubstanzen durchgeführt.

Die Reaktionen zur kovalenten Bindung der biologisch aktiven Verbindungen an die aktivierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate können in Abhängigkeit von der zu bindenden Komponente unter unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen ausgeführt werden. Eine bevorzugte Variante, vor allem für Proteine, besteht darin, daß die biologisch aktiven Verbindungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2,0 bis 12,0 bei 0°C bis 60°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden an die Polymeren kovalent gebunden werden. Eine andere bevorzugte Variante besteht darin, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in wässrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzen Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt. Eine weitere erfindungsgemäße Variante ist dadurch gekennzeichnet, daß Biokatalysatoren und hierbei vorzugsweise Enzyme, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzen Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden kovalent an die substituierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate gebunden werden. Bei den Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln gegebenenfalls freigesetzte Säuren werden durch säurebindende Mittel wie tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate, oder Alkalisalzen kondensierter Aromaten und Heteroaromaten gebunden und neutralisiert.

Für die Isolierung und gegebenenfalls erforderliche Reinigung der an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate kovalent gebundenen, biologisch aktiven Verbindungen stehen eine Vielzahl bekannter Methoden zur Verfügung. Die mit Biokatalysatoren oder mit biokatalytisch inaktiven Proteinen modifizierten Polymeren werden in der Regel aus den wässrigen Reaktionslösungen nach Methoden der Proteingewinnung und Proteinreinigung zum Beispiel durch Dialyse, Ultrafiltration und Gefriertrocknung oder durch Fällungsreaktionen mit anorganischen Salzen und organischen Lösungsmitteln isoliert. Die dabei gewonnenen Produkte können durch chromatographische Methoden wie die Gel-, Ionenaustauscher oder Affinitätschromatographie weiter gereinigt werden. In organischen Lösungsmitteln lösliche Reaktionsprodukte der Umsetzungsreaktionen, besonders die Kopplungsprodukte von niedermolekularen, biologisch aktiven Verbindungen mit den substituierten Polyoxyalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten, werden aus den Reaktionslösungen durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel, gegebenenfalls im Vakuum oder durch Fällungsreaktionen mit anderen organischen Lösungsmitteln oder nach Versetzen der Reaktionslösungen mit Wasser durch Extraktion mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln und Ausfällen aus diesen Lösungsmitteln isoliert. Auch diese Reaktionsprodukte können weiter gereinigt werden, zum Beispiel durch Umfällen, Umkristallisieren oder mit Methoden der Chromatographie. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen in einfacher Weise an Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate kovalent gebunden werden. Durch die kovalente Bindung entstehen neue und stabile Derivate biologisch aktiver Verbindungen. Sie besitzen für die praktische Anwendung vorteilhafte Eigenschaften, da sie in der Regel sowohl in wässrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Dadurch ergeben sich breite und verbesserte Anwendungsfelder dieser modifizierten Polymeren in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin. Die Erfindung wird anhand von Beispielen weiter erläutert.

## Ausführungsbeispiel

### Beispiel 1

1 g w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) in der Form seines Natriumsalzes werden in 7 ml destilliertem Wasser gelöst, und zu der Lösung werden 10 ml Aceton zugegeben. Die Lösung wird auf 5°C bis 10°C abgekühlt und tropfenweise mit einer acetonischen Lösung von 0,8 g Cyanurchlorid in 5 ml Aceton versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach mit 25 ml destilliertem Wasser versetzt und anschließend dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform extrahiert. Das Chloroform wird verdampft, und zum festen Rückstand werden 50 mg in 0,1 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 aufgelöste Penicillinacylase addiert. Nach dem Filtrieren wird die Lösung 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Die Lösung wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeeengt und lyophilisiert.

### Beispiel 2

1 g w,w'-Diamino-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 10 ml 0,05 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 gelöst. Zu der Lösung werden 0,3 ml 25%iger Glutaraldehyd addiert. Die Lösung wird 1 Stunde bei Umgebungstemperatur gerührt, und danach werden 10 mg Cholesterinesterase in lyophilisierter Form zur Lösung addiert. Das Reaktionsgemisch wird 5 Stunden bei 4°C gerührt und anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die resultierende Lösung wird durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeeengt und lyophilisiert.

### Beispiel 3

Entsprechend Beispiel 2 wird das Enzym  $\beta$ -Lactamase kovalent gebunden, mit der Ausnahme, daß ein 0,1 molarer Phosphatpuffer vom pH-Wert 6,4 verwendet wird und das dialysierte und eingeeengte Reaktionsgemisch zur Isolierung und Reinigung des modifizierten Enzyms auf eine mit einem Affinitäts-träger gefüllte Chromatographiesäule aufgetragen und chromatographiert wird.

### Beispiel 4

Entsprechend Beispiel 2 werden die Enzyme Cholesterinoxidase und Lipase (aus *Rhizopus arrhizus*) modifiziert, mit der Ausnahme, daß w-Methoxy-w'-amino-polyethylenglykol verwendet werden.

### Beispiel 5

1 g des Bishydroxamsäurederivates des Polyethylenglykols (MG 6000) wird in 10 ml 0,05 normaler Natronlauge gelöst, mit 1 ml Epichlorhydrin versetzt, und das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das aktivierte Derivat des Polyethylenglykols dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform aus der wäßrigen Lösung extrahiert, das Chloroform wird verdampft, und zum festen Rückstand werden 10 mg Concanavalin A addiert, das in 10 ml 0,1 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 aufgelöst war. Die Lösung wird 9 Stunden bei 30°C gerührt und danach gegen ein Calciumsalz und Zinksalz enthaltendes, destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wird danach auf 2 ml eingeeengt, und das modifizierte Concanavalin A wird durch Fällung mit Ammoniumsulfat isoliert.

### Beispiel 6

Es wird ein Reaktionsgemisch aus 1 g des Bisamidoximderivates des Polyethylenglykols (MG 6000) mit 1 ml 25%igem Glutaraldehyd und 0,1 ml einer Suspension vom Mikroorganismus *Bacillus subtilis* in 20 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 hergestellt, und die resultierende Suspension wird 5 Stunden bei 4°C gerührt. Die Suspension wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, und der Feststoff wird durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt. Zur Isolierung des Feststoffes ohne Dialyse wird dieser mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und zentrifugiert.

### Beispiel 7

1 g w-Methoxy-w'-hydroxamsäure-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 20 ml Chloroform gelöst und 0,4 ml Toluendiliscyanat, aufgelöst in 5 ml trockenem Aceton, werden zur Chloroformlösung addiert. Die Reaktionslösung wird 1 Stunde bei Umgebungstemperatur gerührt, danach auf etwa 5 ml eingeeengt und schließlich mit 50 ml trockenem Ether versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird gesammelt, getrocknet und in dieser Form zu einer Enzymlösung bei 4°C addiert, die hergestellt wurde durch Auflösen von Cholinesterase oder Cholinesterase in destilliertem Wasser. Die resultierende Lösung wird auf Umgebungstemperatur gebracht und 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, die Lösung auf etwa 2 ml eingeeengt und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch Gelchromatographie mit Sephadex G50 weiter aufgetrennt, um die modifizierten Enzyme in reiner Form zu erhalten.

### Beispiel 8

1 g Polyethylenglykol-w,w'-dikarbonsäure-dihydrazid (MG 6000) wird gemeinsam mit 0,5 g Benzochinon in einem Lösungsmittelgemisch aus 15 ml Chloroform und 10 ml Aceton gelöst. Es werden 0,2 g Kaliumkarbonat zur Lösung addiert, und das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird ein fester Rückstand abfiltriert, und die Lösung wird auf 5 ml eingeeengt und mit 50 ml Petrolether versetzt. Der Niederschlag wird abgetrennt, getrocknet und zu 20 ml eines 0,1 molarem Boratpuffers vom pH-Wert 8,0, in dem 20 mg Rinderserum-Albumin aufgelöst waren, addiert. Die Lösung wird 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, auf etwa 2 ml eingeeengt und schließlich lyophilisiert.

**Beispiel 9**

1 g w-Methoxy-w'-mercapto-polyethylenglykol (MG 5000) werden in 25 ml Benzen gelöst, und 0,8 g 2-Methoxy-4,6-dichlor-1,3,5-triazin und 0,5 ml Triethylamin werden zur Lösung addiert. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden bei 80°C gerührt und nach dem Abkühlen dreimal mit jeweils 20 ml destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Die Benzenschicht wird zur Trockne eingedampft, und zum Rückstand werden 10 ml 0,5 molarer Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 addiert, in dem 20 mg Hemoglobin vom Rind aufgelöst waren. Die Lösung wird 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, eingeengt, und der Rückstand wird chromatographisch mit Hilfe einer mit Sephadex G50 gefüllten Säule aufgetrennt. Das erste Säuleneluat enthält das modifizierte Hemoglobin.

**Beispiel 10**

1 g Imidazol, 1 g w,w'-Dimerkapto-polyethylenglykol (MG 6000) und 0,6 g Cyanurchlorid werden in 50 ml trockenem Benzen gelöst, und die Lösung wird 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Die Lösung wird filtriert, mit 20 mg Lipase aus *Rhizopus arrhizus* versetzt, und die Suspension wird 3 Stunden bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird filtriert und das Benzen im Vakuum bei Normaltemperatur entfernt. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und über eine Sephadex G50-Säule chromatographiert. Ein katalytisch aktives, modifiziertes Lipasepräparat wird als erste Fraktion von der Säule eluiert.

**Beispiel 11**

1 g w'-Amidoximderivat des w-Methoxy-polyethylenglykols (MG 5000) werden zu 15 ml frisch destilliertem Dimethylformamid addiert, in dem 0,3 g Hemin und 1,5 g Imidazol aufgelöst waren. Nachdem alle Komponenten aufgelöst waren, wird die Lösung auf eine Temperatur von 0°C bis 4°C gebracht, und zur Lösung wird eine Lösung diazotierten Benzidins addiert. Das Reaktionsgemisch wird auf Umgebungstemperatur gebracht und 2 Stunden gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch in 75 ml destilliertes Wasser eingetragen, und dreimal wird mit jeweils 20 ml Benzen extrahiert. Die Benzenlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, auf 5 bis 10 ml eingeengt und mit 75 ml Petrolether versetzt. Der Niederschlag des mit w-Methoxy-polyethylenglykol modifizierten Komplexes aus Hemin und Imidazol wird gesammelt und bei Umgebungstemperatur getrocknet.

Procedure for the kovalenten connection of biologically active connections to substituted Polyoxyalkylen glycols and their Monoalkoxyderivate

(55) procedure; kovalente connection; Polyoxyalkylenglykolc; biologically active connections; bifunctional activating agents

(57) the invention concerns a procedure for the kovalenten connection of biologically active connections to substituted Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate. Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate with primary amino groups, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids and Karbonsaeurehydrazidgruppen containing, function-hurried groups are transferred in a first reaction step with bi or multi-functional activating agents into activated polymers. In a second reaction step the kovalente connection of biologically active connections, for example of biocatalytically active or inactive proteins and more highly integrated systems is affected such as micro organisms to activate. Polymere one. The conversions are affected in aqueous solutions, organic solvents or mixtures lidfir, if necessary to presence of a acid-binding fund. The modified, biologically active connections are assigned in the biotechnology and medicine.

Patent claims:

1. Procedure for kovalenten connection of biologically active connections to substituted Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate, thereby characterized that biologically active connections at Thiolgruppen, primary amino groups, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids or Karbonsaeurehydrazidgruppen containing polymers, derived from the type of polymer of the Polyoxyalkylenglykole or their Monoalkoxyderivate, which run in aqueous solutions in the pH range of 2 to 12 or organic solvents and/or Loes'ungsmittelgemi from organic solvents or mixtures of aqueous solutions and organic solvents with Refiktionstemperaturen within the range of 0°C to 150°C in from 30 minutes to 8 hours, in presence of a acid-binding fund or a puffersubstanz, with bi or multi-functional activating agents are if necessary activated in aqueous solutions, if necessary buffered or in organic solvents, if necessary in Presence of acid-binding funds or mixtures from aqueous solutions and organic solvents, which are transferred with acid-binding funds if necessary buffered or or mixtures of organic solvents, if necessary likewise in presence of acid-binding funds, in run from 30 minutes to 12 hours at temperatures from 0°C to 150°C are kovalent bound and the isolation and cleaning are affected in actually well-known procedures.

2. Procedure according to demand 1, by the fact characterized that as biologically active connections biocatalysts are inserted such as enzymes, micro organisms, livestock, vegetable and humane cells, Zellorganellen, synthetic enzymes and Koenzyme or biocatalytically inactive proteins such as antigens, anti-body, growth factors, blood clotting factors, interferons, Hemoproteine, albumins, sugar-binding proteins or into vitro manufactured Konjugate from biocatalysts and biocatalytically inactive proteins or down and high-molecular Effektoren such as nucleic acids, fragments of nucleic acids, Koenzyme, peptide, Haptene, hormones, vitamine, medicines, oxygen binding, activating and transporting, synthetic connections as well as affinity ligand.

3. Procedure according to demand 1, by it characterized that as bi or multi-functional activating agents of dialdehyde, diazotierte, aromatic diamines, Diisocyanate, Diisobiocyanate, at the same time

Diisocyanat and Diisothiocyanatgruppen containing connections, to-activated derivatives of Dikarbonsaeuren as saeurechloride, acid azides and activated esters, Diepoxide, Chinone, epihalogenohydrins, Karbodiimide, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine or 2-substituierte, 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine to be assigned.

4. Procedure marked according to demand 1 and 3, thereby that the activation reactions in organic solvents or mixtures of organic solvents in run from 30 minutes to 6 hours at reaction temperatures from 20°C to 80°C are implemented, with acids setting free activation reactions in presence of a acid-binding fund.

5. Procedure according to demand 1 to 4, by the fact characterized that the kovalente connection of the biologically active connections in buffer solutions with pH values from 2,0 to 12.0 runs with 0°C to 60°C in from 1 hour to 12 hours been affected.

6. Procedure according to demand 1 to 4, by the fact characterized that the kovalente connection of the biologically active connections in aqueous solutions, mixtures of these solvents organic with organic solvents, organic solvents or mixtures runs with 0°C to 100°C, with acids setting free reactions in presence of a puffersubstanz or a acid-binding fund, in been affected from 1 hour to 10 hours.

7. Procedure according to demand 1 to 4 and 6, by the fact characterized that the kovalente connection of biocatalysts, preferably from enzymes, runs in organic solvents or mixtures of organic solvents, with acids setting free reactions in presence of a acid-binding fund, with 0°C to 100°C in been affected from 1 hour to 10 hours.

8. Procedure according to demand 1 to 3.4.6 and 7, by the fact characterized that as acid-binding funds tertiary amines, Heterocyclen with endocyclischem, tertiary nitrogen atom, alkali hydroxides, alkali carbonates, alkali alcoholates or alkali salts of condensed aromatics and hetero aromatics are used.

9. Procedure according to demand 1 to 8, by the fact characterized that as biocatalysts enzymes from the classes of the Oxidoreduktasen, Transferaseri, hydrolase and Isomerasen are used.

#### Area of application of the invention

The invention concerns a procedure for the kovalenten connection of biologically active connections to substituted Polyoxyalkylanglykole and their Monoalkoxyderivate. The procedure and the connections manufactured thereafter can be used in dor biotechnology, biochemistry, pharmacy and medicine.

#### Characteristics of the well-known state of the art

Macromolecular connections with amino groups are used less very often and such with Thiol -, Amidoxim -, hydroxamic acid or Karbonsaeurehydrazidgruppen for the immobilization of biologically active connections (Methods Enzymol. 1988,137, [ Immobilized of enzyme and Cells), Pt. A-D, OD by K. Mosbach). In this form referred to and the function-hurried the macromolecules provided with groups can be used with Immobilisierungsreaktionen however only, if reactive, high-activated groups possessing, biologically active connections to the macromolecules kovalent to be bound to be supposed. Normally activated with immobilization reactions however the macromolecular connections with groups referred to and the function-hurried front kovalenten connection of the biologically active connections, which



means practically that the function-hurried groups of the macromolecules must be transferred into such a reactive condition that a dilution reaction of both components can be affected.

In Amino -, Thiol -, Amidoxim -, Karbonsaeurehydrazid - and group of hydroxamic acids in latter connections the Oximgruppe = NOH can likewise be present as tautomere form - containing connections possess the functional groups nukleophile characteristics, so that the nukleophilen substitution reactions and also most different addition reactions are accessible. These reaction types belong to the fundamental reactions of synthesis chemistry, and in this way new connections can be synthesized by a large number of linkage reactions of two or several well-known connections. These reaction principles are used also for the activation, of the unsolvable macromolecules suitable for the immobilization of biologically active connections such as cellulose, Sapharosen, Sephadex or Polyhydroxyethylmethakrylate. With benefit in these cases bi and/or multi-functional, are very often used low-molecular activating agents because after a reaction step the macromolecule in activated form is in this way already present. Under bi or multi-functional and for the activation activating agents suitable by macromolecules are a large number of easily accessible, chemical reagents, which are applicable for an activation. Some important s!U for example dialdehyde, activated Dikarbonsaeurederivate, aliphatic aromatic and heteroaromatic Dihalogenide made reactively by activation and/or more highly connections and funktionalisierte and at the same time reactively made Diaminoverbindungen halogenierte.

In aqueous solutions and organic solvents soluble polymers of the type of the Polyoxyalkylenglykole unmd their Monoalkoxyderivate are for various application, medical research applied by interest, particularly in the biotechnology and. That presupposes the Funktionalisierung in each case also this polymers, best by kovalente linkage, with biologically active connections. This kovalente connection of biologically active connections requires however that first of all reactive derivatives are present polymers referred to, which are qualified for these linkage reactions. The methods to the activation and Funktionalisierung with biologically active connections of the hydroxylgruppenhaltigen Polyoxyalkylenglykole and the Monoalkoxyderivate, described so far, this polymers (Life is, 1983.33.1467-1473) are not sufficient for a broad application however with security. With primary amino groups, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids or Karbonsaeurehydrazidgruppen substituted derivatives of the Polyoxyalkylenglykole and their homogeneously substituted Monoalkoxyderivate represent just as suitable derivatives this to polymers, in order to bind biologically active connections to it kovalent, particularly since with these reactive groups substituted polymers of the kind referred to from the hydroxylgruppenhaltigen output polymers can be synthesized by normally simple chemical reactions.

#### A goal of the invention

The goal of the invention consists of it, biologically active connections on with primary amino groups, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids or Karbonsaeurehydrazidgruppen substituted polymers of the referred to of the type of the Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate after activation binding function-hurried groups kcovalent. Thus modified, biologically active connections with broad application possibilities are to be preserved.

## Statement of the nature of the invention

Task of the invention is it, with primary Aminogruppend, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids and Karbonsaeurehydrazidgruppen substituted Polyoxyalkylenglykole or its likewise substituted Monoalkoxyderivate into an activated form to transfer and to these activated polymers biologically active connections kovalent bind. According to invention by the fact it is achieved that primary amino groups, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids or Karbonsaeurehydrazidgruppen containing polymers, derived of the type of the Polyoxyalkylenglykole or their Monoalkoxyderivate, runs in w2rlgen solutions within the pH range from 2,0 to 12,0 or organic solvents and/or mixtures of organic solvents or mixtures from aqueous solutions and organic solvents at reaction temperatures within the range of 0°C to 150°C in from 30 minutes to 8 hours, if necessary in presence of a puffersubstanz or a acid-binding fund, with bi or multi-functional activating agents is converted and activated and to activated polymers in aqueous solutions, those is if necessary buffered or mixtures the these with organic solvents or in organic solvents or into Gerni organic solvents, in the latters both cases in presence of acid-binding funds, in run if necessary from 30 minutes to 12 hours at temperatures from 0°C to 150°C biologically active connections to be kovalent bound. As biologically active connections for connection according to invention and the kovalente to Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate down and high-molecular connections are used. Apart from your biological effectiveness is for a successful and stable connection to polymers referred to being present reactive, funktioneller groups the additional condition. Biocatalytically active connections become according to invention such as enzymes - such from the classes of the Oxidoreduktasen, transferasen, hydrolase and Isomerasen Mikroorganismen, livestock, vegetable and humane cells, Zellorganellen, synthetic enzymes or Koenzyme prefers, in addition, biocatalytically inactive proteins such as Antigene, anti-bodies, growth factors, blood clotting factors, interferons, Hemoproteine, albumins and sugar-binding proteins like the Lektine kovalent bind. Other biologically active connections, which cannot be attached to the categories specified before and which are for a kovalente connection at Polyoxyalkylenglykole and its Monoalkoxyderivate to be applicable, for example nucleic acids, fragments of nucleic acids, Koenzyme, Peptide, Haptene, hormones, vitamine, medicines as well as oxygen binding, transportierende and activating, synthetic connections. When bi or multifunktionelle activating agents for with primary Aminogruppend, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, groups of hydroxamic acids or Karbonsaeurehydrazidgruppen become substituted Polyoxyalkylenglykole and its Monoalkoxyderivate dialdehyde, aromatic, diazotierte diamines, Disocyanate, Diisothiocyanate, saeurechloride, acid azides, and activated esters used of Dikarbonsaeuren, Diepoxide, Chlone, Karbodiimide, Epihalogenhydrine, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine, or 2-substituierte, 4, 6-Dihalogen-1, 3, 5-triazine, whereby the selection is determined bi or multi-functional activating agents also by reactivity substituted polymers. The activation reactions are implemented preferably in organic solvents and then at reaction temperatures from 20°C to 80°C in run from 30 minutes to 6 hours. Since with a set of reactions acids are set free, in these cases in presence of a acid-binding fund one works, for example a tertiary amine, Heterocyclen with endocyclischem, teritiarem nitrogen atom, alkali hydroxides, alkali carbonates, alkali alcoholates or alkali salts of condensed aromatics and hetero aromatics. The likewise possible activation reactions with a row bi or multi-functional activating agents in aqueous solutions are preferably accomplished with acidless-setting reactions in presence of puffersubstanzen.

The reactions for the kovalenten connection of the biologically active connections to the activated Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate can be implemented as a function of the component on most divergent reaction conditions, which can be bound. A preferential variant, particularly for proteins, consists of the fact that the biologically active connections in buffer solutions with pH values from 2,0 to 12,0 with 0°C to 60°C in run from 1 hour to 12 hours at polymers are kovalent bound. Another preferential variant consists of the fact that the kovalente connection of the biologically active connections in aqueous solutions, mixtures of these solvents organic with organic solvents, organic solvents or mixtures runs with 0°C to 100°C, with acids setting free reactions in presence of a saeurebindonden fund, in been affected from 1 hour to 10 hours. A further variant according to invention is characterized by the fact that biocatalysts and here preferably enzymes, in organic solvents or mixtures of organic solvents with 0°C to 100°C, with acids setting free reactions in presence of a acid-binding fund, in run from 1 hour to 10 hours kovalent to the substituted Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate are bound. With the conversions in organic solvents if necessary set free acids become by acid-binding funds like teritiaere amines, Heterocyclen with endocyclischem, tertiary nitrogen atom, alkali hydroxides, alkali carbonates, alkali alcoholates, or bind for alkali salts of condensed aromatics and hetero aromatics and neutralizes.

For the isolation and if necessary necessary cleaning to substituted Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate bound, biologically active connections is available a large number of well-known methods kovalent. With biocatalysts or with biocatalytically inactive proteins modified polymers normally from the aqueous reaction solutions according to methods of the protein production and protein cleaning for example by dialysis, ultrafiltration and freezing drying process or by precipitation reactions with inorganic salts and organic solvents are isolated. The products won thereby can by chromatographische methods like the gel -, ion exchangers or affinity chromatography to be further cleaned. In organic solvents soluble reaction products of the conversion reactions, the coupling products of low-molecular, biologically active connections with the substituted Polyoxyalkylenglykolen and their Monoalkoxyderivaten, are not particularly isolated from the reaction solutions by evaporation of the organic solvents, if necessary in the vacuum or by precipitation reactions with other organic solvents or after shifting the reaction solutions with water by extraction also in water soluble or mixable, organic solvents and losses from these solvents. Also these reaction products can be further cleaned, for example by falling down, recrystallizing or with methods of the chromatography. With the help of the procedure according to invention can be bound a large number of biologically active connections in simple way to polymers of the type of the Polyoxyalkylenglykole and their Monoalkoxyderivate kovalent. From the kovalente connection new and stable derivatives of biologically active connections result. They possess favourable characteristics for practical application, since they are soluble normally both in aqueous solutions and in organic solvents. Thus spread and improved application fields result this modified polymers in the biotechnology, biochemistry, pharmacy and Madzin. The invention is continued to describe on the basis examples.

#### Implementation example

##### Example 1

1 g w, w'-Dimercapto-polyethylenglyko! (mg 6000) in the form of its

sodium salt in 7 ml distilled water are solve, and to that solution 10ml acetone are course-dripped. The solution is cooled down to 5°C to 10°C and shifted drop by drop with a acetonschen solution by 0,8g Cyanurchlorid in 5ml acetone. The reaction mixture is agitated 3 hours with ambient temperature, shifted after it with 25ml distilled water and extracted afterwards three times with in each case 15ml chloroform. The chloroform one evaporates, and to the firm arrears 50mg in 0,1 molecular borate buffer are added by the pH value 10.0 dissolved Penicillinacylase. After filtering the solution is agitated 8 hours with ambient temperature. The solution is dialysiert thereafter against distilled water, restricted and lyophilisiert by ultrafiltration on 2 ml.

#### Example 2

1 g wx Diamino polyethylene glycol (mg 6000} in 10 ml 0.05 molecular phosphate buffer from the pH value 7.0 are solve. To the solution 0,3ml 25%iger Glutaraldehyd are added. The solution is agitated 1 hour with ambient temperature, and afterwards 10mg Cholesterinostomse in lyophilisiert form are added for solution. The reaction mixture is agitated 5 hours with 4°C and dialysiert afterwards against distilled water. The resulting solution is restricted and lyophilisiert by ultrafiltration on 2ml.

#### Example 3

According to example 2 the enzyme ss-Lactamase is kovalent bound, with the exception that 0.1 molecular phosphate buffers by the pH value 6.4 one uses and the dialysierte and restricted Reaktionsgemisch the isolation and cleaning of the modified enzyme on a chromatography column filled with a Affinitätssträflger laid on and chromatographies becomes.

#### Example 4

According to example 2 the enzymes Cholesterinoxidase and lipase (from *Rhizopus arrhizus*) are modified, with that

Exception that w-Methoxy-w'-amino-polyethylene glycol are used.

#### Example 5

1 g of the Bishydroxamsaeuredeivates of the polyethylene glycol (mg 6000) is shifted solve in 10ml 0.05 of normal caustic soda solution, with 1 ml epichlorohydrin, and the Redktionsgemisch is heated up 3 hours on 80°C. After the cooling the activated derivative of the polyethylene glycol is extracted three times with in each case 15ml chloroform from the aqueous solution, which chloroform evaporated, and to the firm arrears 10mg Concanavalin A are added, in 10 the ml 0,1 molecular borate buffer by the pH value 10.0 was dissolved. The solution is agitated 9 hours with 30°C and dialysiert afterwards against a calcium salt and a zinc salt containing, distilled water. The solution is restricted thereafter on 2ml, and the modified Concanavalin A is isolated by precipitation with ammonium sulphate.

#### Example 6

A reaction mixture is made of 1 g of the Bisamldoximderivates of the Polyethyfynglykols (mg 6000) with 1 ml 25%igem Glutaraldehyd and 0.1 ml a suspension by the microorganism *Bacillus subtilis* in 20ml 0.1 molecular phosphate buffer by the pH value 7.0, and the resulting suspension is agitated 5 hours with 4°C. The suspension is dialysiert thereafter against distilled water, and the solid is separated by

Zentrifugation from the solution. For the isolation of the solid without dialysis this is washed several times and centrifuged with distilled water.

#### Example 7

1 g w-Methoxy-w'-hydroxamic acid-polyethylene glycol (mg 5000) solve in 20ml chloroform and 0,4ml Toluendiisocyanat, dissolved in 5ml dry acetone, will become the chloroform solution added. The reaction solution is agitated 1 hour with ambient temperature, restricted after it to for instance 5ml and finally shifted with 50ml dry ether. The failed precipitation was collected, dried and added in this form to an enzyme solution with 4°C, manufactured by Auloesen water distilled of Cholinoxidase or cholinesterase in. The resulting solution is brought on ambient temperature and 1 hour at this temperature is agitated. Afterwards against distilled water one dialysiert, which lyophilisiert solution on for instance 2ml restricted and. The arrears are continued to isolate by Gelchromatographia with Sephadex G50, in order to preserve the modified enzymes in pure form.

#### Example 8

1 g polyethylene glycol w.w' dikarbonsa'ure dihydrazid (mg 6000) is solved together with 0,5g Benzochinon in a solvent mixture from 15ml chloroform and 10ml acetone. 0,2g potassium carbonate are added for solution, and the reaction mixture is agitated 3 hours with 50°C. After the cooling firm arrears are filtered off, and the solution is restricted to 5ml and shifted with 50ml petrolether. The precipitation separated, dried and to 20ml 0.1 molecular of borate buffer from the pH value 8.0, in the 20mg cattle serum albumin dissolved were added. Dia. solution is agitated 0 hours with ambient temperature, dialysiert afterwards against distilled water, restricted on approximately 2 ml and finally lyophilisiert.

#### Example 9

1 g w-Methoxy-w'-mercapto-polyethylene glycol (mg 5000) in 26 ml Benzen are solve, and 0.8 g 2-Methoxy-4,6-dichlor-1,3,5-triazin and 0,5ml tri ethyl amine are added to the Laesung. The reaction mixture wlrld 4 hours bal 80°C agitated and after the cooling three times with in each case 20ml destilliertem water out-vibrated. The Benzenschicht is evaporated to dry ones, and to the arrears 10ml 0.5 molecular borate buffer by the pH value 10.0 added, in the 20mg Hemoglohin of the cattle were dissolved. The solution is agitated 8 hours with ambient temperature, dialysiert, restricted afterwards against distilled water, and the arrears are isolated chromatographisch with the help of a column filled with Sephadex G50. The first Saeuleneluat contains the modified Hemoglobin.

#### Example 10

1 g Imidazol, 1 g w^Dimercapto-polyethylene glycol (mg 6000) and 0,6g Cyanurchlorid are solve in 50ml dry Benzen, and the solution is agitated 3 hours with ambient temperature. The solution is shifted filtered, with 20mg lipase from Rhizopus arrhizus, and the suspension is agitated 3 hours with 60°C. After the cooling and the Benzen in the vacuum with standard temperature is filtered is removed. The arrears are raised in distilled water and chromatographiert over a Sephadex G50-Saeule. A biocatalytically active, modified Lipasepraeparat is eluiert as a first parliamentary group of the column.

#### Example 11

1 g w'-Amidoximderivat of the w-Methoxy-polyethylene glycol (mg 5000) to 15ml freshly distilled dimethylformamide are added, in which 0,3g Hemin and 1,5g Imidazol were dissolved. After all components were dissolved, the solution is brought on a temperature from 0°C to 4°C, and added for solution a solution dlazotierten benzidine. The reaction mixture is brought on ambient temperature and 2 hours is agitated, afterwards the reaction mixture is registered in 75ml distilled water, and three times with in each case 20ml Benzen one extracts. The Benzenloesung is dried with sodium sulfate, restricted to 5 to 10ml and shifted with 75ml petrolether. The precipitation with w-Methoxy-polyethylsnglykol modified complex from haemin and Imidazol is collected and dried with ambient temperature.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**